

Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.)

Isolation and characterization of strains of the *Bacillus* associated to rice (*Oryza sativa* L.) crop.

BADÍA, Marcia M. Rojas^{1*}, HERNÁNDEZ, Berto Tejera¹, MURREL, Jeny A. Larrea¹, MAHILLON, Jacques², PÉREZ Mayra Heydrich¹.

1 Dpto. de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Habana-Cuba.

2 Laboratory of Food and Environmental Microbiology, Université Catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve- Belgium

*Autor para la correspondencia: Marcia M. Rojas Badía. e-mail: marcia@fbio.uh.cu

RESUMO

El presente trabajo muestra el aislamiento y la caracterización de bacterias del género *Bacillus* provenientes de la rizosfera del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) variedad J-104 utilizando el modelo microcosmos. Se realizaron además aislamientos directos del suelo que se encontraba cultivado con la variedad INCA LP-5. Se llevó a cabo la caracterización fisiológica de 13 aislados en cuanto a la producción de compuestos indólicos, la determinación de antagonismo frente a hongos fitopatógenos del arroz (*Alternaria solani*, *Pyricularia grisea*, *Fusarium* sp. y *Curvularia* sp.), la capacidad de solubilización de fosfatos y la determinación cualitativa de la fijación de nitrógeno. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se seleccionaron a través de un análisis de conglomerado (cluster), los aislados más promisorios para su identificación utilizando las pruebas morfológicas, tintoriales y bioquímicas propuestas por el Manual de Bergey y la secuenciación del ADN ribosómico 16S.

PALAVRAS-CHAVE: *Bacillus*, arroz, control biológico, promoción del crecimiento vegetal

ABSTRACT

This work shows the isolation and characterization of *Bacillus* strains from rhizosphere of rice crop (*Oryza sativa* L.). Two isolation methods were used, microcosm model to isolates bacteria from variety J-104 and direct isolation from soil cultivated with INCA LP-5 variety. Physiological characterization of 13 isolates was carried out, considering indole compounds production, phosphate solubilization, qualitative nitrogen fixing ability and antagonistic effect against phytophogenic fungi of rice (*Alternaria solani*, *Pyricularia grisea*, *Fusarium* sp. and *Curvularia* sp.). A conglomerated cluster analysis was performed to select the best isolates to be identified by biochemical test and 16SrDNA sequencing.

KEY WORDS: *Bacillus*, rice, biological control, plant growth promotion

Introducción:

El arroz es uno de los cereales más importantes en el mundo y particularmente en Cuba constituye un alimento básico en la dieta de la población. En muchos países como Tailandia, India, Viet-Nam, China y Perú y en el mundo en general se ha incrementado la producción anual de arroz en los últimos años (FAO, 2008). Sin embargo, hace más de una década se está observando un descenso en la productividad y en la calidad del suelo de muchas áreas arroceras en las que se lleva cabo un cultivo intensivo (NEZARAT and GHOLAMI, 2009).

Considerando la importancia para la alimentación del ser humano y que los procesos naturales constituyen alternativas ecológicas y económicas para la sustitución parcial o total de fertilizantes químicos, se trabaja en función de utilizar los microorganismos con el objetivo de elevar las producciones de los cultivos agrícolas, y a la vez, contrarrestar el impacto negativo sobre el medio ambiente.

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) representan una gran variedad de microorganismos endófitos y rizosféricos, los cuales estimulan el crecimiento de sus hospederos. Estas bacterias pueden incrementar el crecimiento de las plantas a través de la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, la producción de fitohormonas, sideróforos, 1-aminociclopropanil-1-carboxilato (ACC) desaminasa, (KHAN et al., 2009).

Por otra parte, las PGPB son potenciales agentes de control biológico, un importante método que resurge para el manejo de las enfermedades de las plantas y a su vez, numerosos hongos son fitopatógenos de este cultivo, causando grandes pérdidas en las cosechas (COMPANT et al., 2005).

El género *Bacillus*, tiene una amplia distribución en diferentes tipos de ambientes como el suelo (ASLIM et al., 2002), los ecosistemas de agua dulce (MANDAL et al., 2005) y los marinos

(Miranda et al., 2008), así como en ecosistemas extremos (KAYODE-ISOLA et al., 2008). Se ha aislado a partir de cultivos de importancia económica como el arroz (THAKURIA et al., 2004), demostrándose que cepas de este género tienen la capacidad de solubilizar fósforo (SOUCHIE et al., 2006), fijar nitrógeno (BENEDUZI et al., 2008), producir auxinas (GUTIERREZ-MAÑERO et al., 1996) y sustancias antagónicas contra diferentes hongos fitopatógenos (WIPPS et al., 2001). Por otra parte, los miembros de este género presentan características como las endosporas que le confiere resistencia a la desecación y al calor, es por ello que es un candidato ideal para formular productos estables y su utilización en la Biotecnología Agrícola (LIU et al., 2006). Teniendo en cuenta estos antecedentes y la importancia de contar con cepas que presenten estas potencialidades para ser utilizadas posteriormente en la Agrobiotecnología, nos propusimos en este trabajo aislar y caracterizar representantes del género *Bacillus* con potencialidades para la promoción del crecimiento y el control biológico de patógenos en el cultivo del arroz.

Materiales y Métodos

Aislamientos de rizobacterias del género *Bacillus*

En este estudio se realizaron muestreos en campos sembrados con arroz pertenecientes a las parcelas del Instituto de Investigaciones del Arroz (Bauta, Provincia La Habana). Los aislamientos se realizaron a partir de suelos de diferentes variedades utilizando dos métodos: el modelo microcosmos (KABIR et al., 1995) para la variedad J-104 y aislamiento directo de suelo para la variedad INCA LP-5.

Se tomó 1 g de las raíces o el suelo según corresponda y se hicieron diluciones decimales seriadas hasta 10⁻⁶ que se calentaron a 80°C

durante 30 minutos y se sembraron 0.1 mL por diseminación en medio Agar Triptona Soya (TSA).

De las placas de TSA con crecimiento se tomaron muestras de las colonias con características diferentes y se pasaron a placas por agotamiento para su purificación. Se le realizó una observación microscópica con tinción de Gram para comprobar la pureza y determinar las características micromorfológicas y tintoriales de los mismos, así como la presencia de esporas. Los aislados puros se conservaron en tubos de agar nutriente y glicerol al 15 %.

Determinación de la producción de compuestos indólicos

Para la determinación cuantitativa de la producción de compuestos indólicos se utilizó el medio líquido Caldo Triptona Soya ajustando la concentración celular al 10^8 células.mL⁻¹, según la escala McFarland (NCCLS, 1993) y se incubaron durante 24 horas, bajo condiciones de agitación a una temperatura de 30°C. La determinación se realizó mediante el método de Salkowski (GLICKMANN and DESSAUX, 1994). Posterior a la reacción se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 535 nm utilizando un espectrofotómetro (Genesys 20). Este experimento se realizó con tres réplicas por aislado y como control negativo se utilizó el medio correspondiente sin inocular. Previamente se realizó una curva patrón de AIA sintético.

Determinación de la capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos

Se inocularon placas de medio NBRIP (NAUTIYAL et al., 1999) sólido con 10µL de los preinóculos y se incubaron a 30°C durante 48 horas. Se calculó la capacidad de solubilización de fosfatos para cada cepa para lo que se restaron los diámetros de las zonas de crecimiento y de solubilización de cada cepa (SILVA et al., 2007).

Determinación cualitativa de la capacidad de

fijación de nitrógeno

Para la realización de ensayo se preparó medio semisólido libre de nitrógeno (WILSON, and KNIGHT, 1952) y se inocularon con los aislados obtenidos con el objetivo de determinar si estos tenían la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico. Como control negativo se utilizó medio sin inocular. Se observó la capacidad de los aislados para crecer en medio sin nitrógeno, lo cual se indica como positivo o negativo según la presencia o no de crecimiento.

Determinación del efecto antagónico

Se utilizaron cuatro cepas de hongos fitopatógenos del cultivo del arroz. Estos hongos fueron *Pyricularia grisea*, *Alternaria solani*, *Fusarium* sp. y *Curvularia* sp. Se realizaron bioensayos in vitro con el objetivo de determinar el efecto antagónico siguiendo la metodología propuesta por BASHAN et al. (1996).

Se realizaron tres réplicas por aislado, incubando a 30°C durante 11 días. La actividad antagónica de los aislados se determinó a través de la medición del diámetro de crecimiento del hongo patógeno en presencia del antagonista bacteriano. Como control negativo se utilizaron tres placas donde se encontraba solamente el hongo. Con las mediciones obtenidas se procedió al cálculo del porcentaje de inhibición, el cual se determinó por la siguiente ecuación:

Porcentaje de inhibición = $((D.C.C - D.C.P)/D.C.C) * 100$ donde:

D.C.C: diámetro de la colonia control.

D.C.P: diámetro de la colonia problema.

Análisis biométricos

Para los análisis biométricos se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza a todas las variables de los experimentos y después del ANOVA se aplicaron métodos paramétricos o no paramétricos según el caso

Aislamiento y caracterización

utilizando el programa Statistica para Window versión 6.0. El agrupamiento de las cepas se realizó mediante un análisis de conglomerado aplicando la distancia Euclidiana.

Identificación preliminar de los aislados seleccionados

Se realizaron las pruebas de identificación recomendadas en el Manual de Bergey para la Familia Bacillaceae (CLAUS and BERKELEY, 1986). Posteriormente se seleccionaron cuatro aislados para la secuenciación parcial de gen que codifica para el ARN ribosómico 16S para lo que se tomaron colonias de 18 horas de crecimiento en medio LB. La amplificación se llevó a cabo utilizando los cebadores universales Univ1: 5`ACTCCTACGGGAAGGCAG y Bact4: 5`GGCGTGTGTACAAGGCCCGG y en un volumen final de 50 µL compuesto por una mezcla de reacción con concentraciones de 200 µM de dNTP, 1 µM de cada cebador, 1.5 mM de MgCl₂ y 0.02 unidades. µL⁻¹ de enzima GoTaq polimerasa. El programa de PCR se inició con un ciclo de 5` a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 30` a 94 °C, 30` a 55 °C y 1` a 72 °C y un ciclo de elongación final de 7` a 72 °C. Los productos de PCR obtenidos se secuenciaron en el Servicio de secuenciación de la Universidad Católica de Lovaina (Lovaina la Nueva, Bélgica).

Resultados y Discusión:

A partir de los aislamientos realizados se obtuvieron siete aislados de la rizosfera de la variedad J-104 y seis del suelo de la variedad INCA LP-5 que tenían forma bacilar, respondían positivamente a la tinción de Gram, presentaban endospora y resistieron el calentamiento a 80 °C a que se sometieron las muestras durante el proceso de aislamiento.

Renche and Fiuza (2005), al analizar la diversidad de bacterias en aguas de irrigación de los campos sembrados con arroz en diferentes

etapas del cultivo obtuvieron que el género *Bacillus* representaba el 39% de los 315 aislados, lo que denota la predominancia de éste en la población bacteriana total.

Empleando el método de Salkowski se cuantificaron las auxinas producidas por los aislados obtenidos (Fig. 1). Se destacan los aislados JRRB8 y JRRB9 con los mejores resultados, los cuales concuerdan con los obtenidos por Swain et al. (2007).

En la figura 1 se observa un resultado interesante y es que las mayores concentraciones de AIA son producidas por los aislados rizosféricos asociados a la variedad J-104, lo que podría indicar que en los exudados radicales de esta variedad se liberan precursores que favorecen la síntesis de compuestos indólicos y específicamente AIA, cuando se establece una interacción activa entre la bacteria y la planta. Es importante destacar que estos aislados se obtuvieron a partir de muestras de suelo sembrado con plantas jóvenes, donde se aprovechan los beneficios de la interacción planta-microorganismo.

En este sentido, Brencic and Winans (2005) señalaron que la capacidad de producir auxinas responsables de la elongación de las raíces, a partir del triptófano, es común entre los microorganismos del suelo, por lo que muchos autores consideran que la síntesis de este compuesto es dependiente del triptófano presente en los exudados radicales liberados por las plantas.

Otra forma a través de la cual las bacterias pueden contribuir al crecimiento de las plantas es proporcionando nutrientes como los fosfatos de una manera asequible para la misma. La capacidad de solubilizar fosfatos inorgánicos se puso de manifiesto por la formación de un halo transparente en el medio NBRIP con un diámetro entre 2 y 4 mm para los aislados RRB1, RRB3, RRB6, RRB7, LSB3, LSB4, LSB9, LSB10 y LSB11, a las 48 horas de incubación, o sea cuatro

de los aislados obtenidos no tienen esta capacidad (Tabla 1). Otros autores habían obtenido resultados similares para este género asociado a hierbas de forraje (SOUCHIE et al., 2006) y basado en esta capacidad se han utilizado para la producción de inoculantes (TRIVERDI et al., 2007).

El aislado LSB11 produce cambio de coloración del indicador de pH (bromofenol azul) en el medio de cultivo de azul a amarillo, por lo que se puede afirmar que la solubilización de fosfatos de este aislado se lleva a cabo mediante un mecanismo que involucra la producción de ácidos orgánicos, lo que se ha descrito para bacterias de la especie *Bacillus megaterium* y *Pseudomonas fluorescens* (ALIKHANI et al., 2007).

Por otra parte, los aislados se cultivaron en medio semisólido libre de nitrógeno obteniendo crecimiento en once aislados (Tabla1), lo que

constituye una prueba cualitativa presuntiva de la capacidad de fijar dinitrógeno. Este hecho se ha descrito en algunas cepas del género *Bacillus* (BENEDUZI et al., 2008) y otros asociados. Se ha observado que algunas especies de este género tales como *B. fusiformis* aisladas de maíz, trigo y arroz presentan una alta actividad nitrogenasa, lo que implica que sean buenos fijadores de dinitrógeno (PARK et al., 2005).

En el presente trabajo se analizó el efecto antagónico de los aislados obtenidos contra cuatro hongos fitopatógenos del cultivo del arroz, obteniendo en la mayoría de los casos inhibición del crecimiento de los mismos (Fig. 2). En el caso de *P. grisea*, el mejor efecto antagónico lo ejerce el aislado LSB4 con 91,8% de inhibición del crecimiento (Fig. 2A); para el hongo *A. alternata*, los mayores porcentajes de inhibición se verifican en los aislados LSB4 y LSB10 con 87,28 y 85,61%

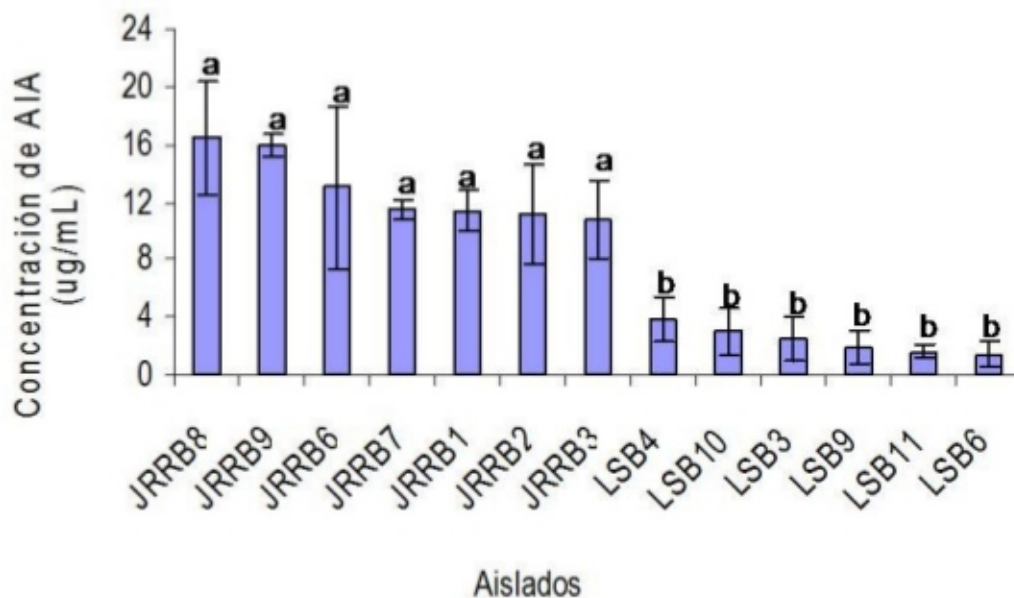


Fig. 1: Producción de auxinas por aislados asociados al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Las barras de error señalan la desviación estándar de tres repeticiones. Letras no comunes indican diferencias significativas entre tratamientos.

Aislamiento y caracterización

respectivamente (Fig. 2B); *Fusarium sp.* es inhibido mayoritariamente por LSB9 (90,42%) y LSB4 (90,04%) (Fig. 2C); y en el caso de *Curvularia* la mejor inhibición la ejercen LSB4, LSB9 y LSB10 con un porcentaje de 91,95% cada uno (Fig. 2D).

De manera general, los mejores resultados corresponden a los aislados LSB4, LSB9 y LSB10, los cuales inhiben el crecimiento de los cuatro hongos en mayores porcentajes, los cuales se encuentran entre el 85 y el 92%.

El efecto protector de los miembros del género *Bacillus* utilizados en el control de enfermedades fúngicas, puede deberse a la presencia de diferentes mecanismos para antagonizar de forma directa el crecimiento de patógenos (ZAHIR et al., 2004). Varios autores han informado la actividad antagónica del género *Bacillus* contra diferentes hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (BERG

et al., 2005, WU et al., 2005), lo que se atribuye a la producción de antibióticos (ZHAO et al., 2008), enzimas (IDRISS et al., 2002), entre otros.

Para la selección de los mejores aislados integralmente se realizó un análisis de conglomerado (Fig. 3). Considerando el 20% como punto de corte en la distancia de unión, se puede observar que se forman cuatro grupos bien definidos, uno del aislado JRB8 con el control negativo, otros dos que tienen valores intermedios en sus potencialidades y formados por dos y cuatro cepas respectivamente, y un cuarto, en el que se agrupan cuatro aislados con el control positivo, formado por los mayores valores de cada experimento. Por otra parte, los aislados JRRB9 y LSB11 no se agrupan con ninguno de los mencionados. Teniendo en cuenta estos resultados se seleccionaron los aislados LSB4,

Tabla 1: Solubilización de fosfatos inorgánicos en medio NBRIP y fijación de nitrógeno por aislados de *Bacillus* obtenidos del cultivo del arroz.

Aislados	Fijación Biológica de Nitrógeno (cualitativo) 48 h	Índice de Solubilización de Fosfatos (cm) 48 h
JRRB1	+	0.30
JRRB2	-	0
JRRB3	-	0.33
JRRB6	+	0.30
JRRB7	+	0.30
JRRB8	+	0
JRRB9	+	0
JPB3	+	0.30
LSB4	+	0.30
LSB6	+	0
LSB9	+	0.30
LSB10	+	0.30
LSB11	+	0.30

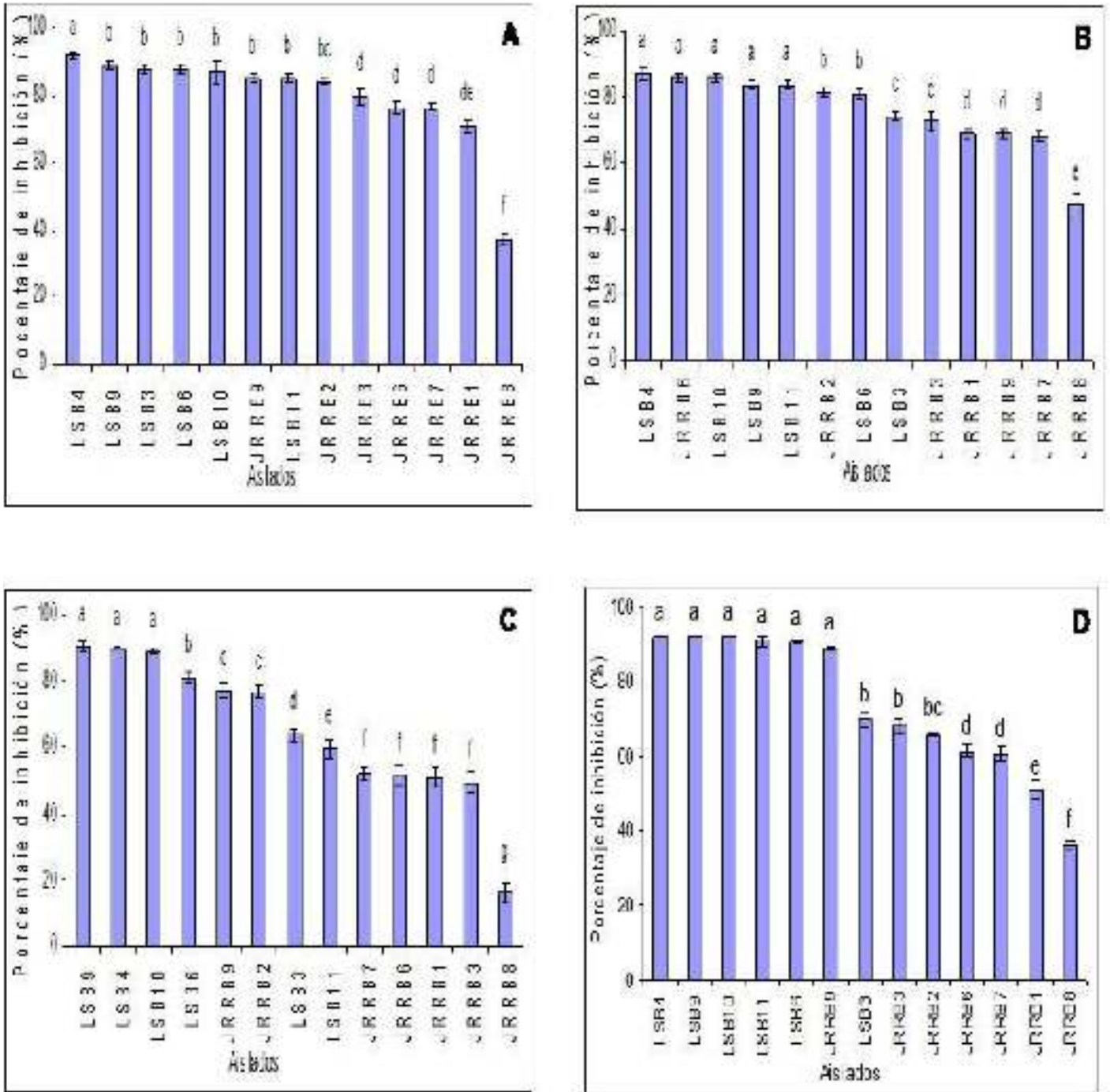


Fig. 2: Efecto antagónico de aislados asociados al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.) contra hongos fitopatógenos del mismo. A: *Pyricularia grisea*, B: *Alternaria alternata*, C: *Fusarium sp.*, D: *Curvularia sp.*. Letras no comunes para un mismo hongo indican diferencias significativas entre el porcentaje de inhibición producido por los aislados.

Aislamiento y caracterización

LSB6, LSB9 y LSB10 para su identificación.

A estos aislados se les realizaron las pruebas morfológicas y fisiológico-bioquímicas correspondientes y se identificaron las cepas LSB4, LSB6, LSB9 y LSB10 como pertenecientes al género *Bacillus* de acuerdo al Manual de Bergey (CLAUS and BERKELEY, 1986). Estas cepas se depositaron en el Cepario del Laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Biología para la determinación de su efecto en la planta. Teniendo en cuenta la complejidad actual en la clasificación de este género (EUZEBY, 2009) es necesaria su identificación con técnicas moleculares.

Los resultados de la secuenciación del ADNr 16S y su comparación con secuencias similares en el GenBank para la determinación del nivel de especie se identificaron LSB4 y LSB10 como

Bacillus subtilis, LSB6 como *B. cereus* y LSB9 como *Bacillus* sp.

Los miembros de este género tienen un gran potencial para su uso en la agricultura. Muchas cepas tienen la capacidad de producir metabolitos antimicrobianos para el control de patógenos, fijan dinitrógeno, presentan una alta velocidad de crecimiento, forman endosporas resistentes a la desecación, el calor y las radiaciones ultravioletas y sobreviven en diversas condiciones (LIU et al., 2006), lo que ofrece perspectivas en la obtención de biopreparados eficientes. Si contamos con cepas que tengan, a la misma vez, la capacidad de ejercer efecto antagónico contra un amplio grupo de hongos fitopatógenos y de promover el crecimiento de la planta a través de diferentes mecanismos, se podría obtener un bioproducto a partir de estas bacterias que sustituya fertilizantes

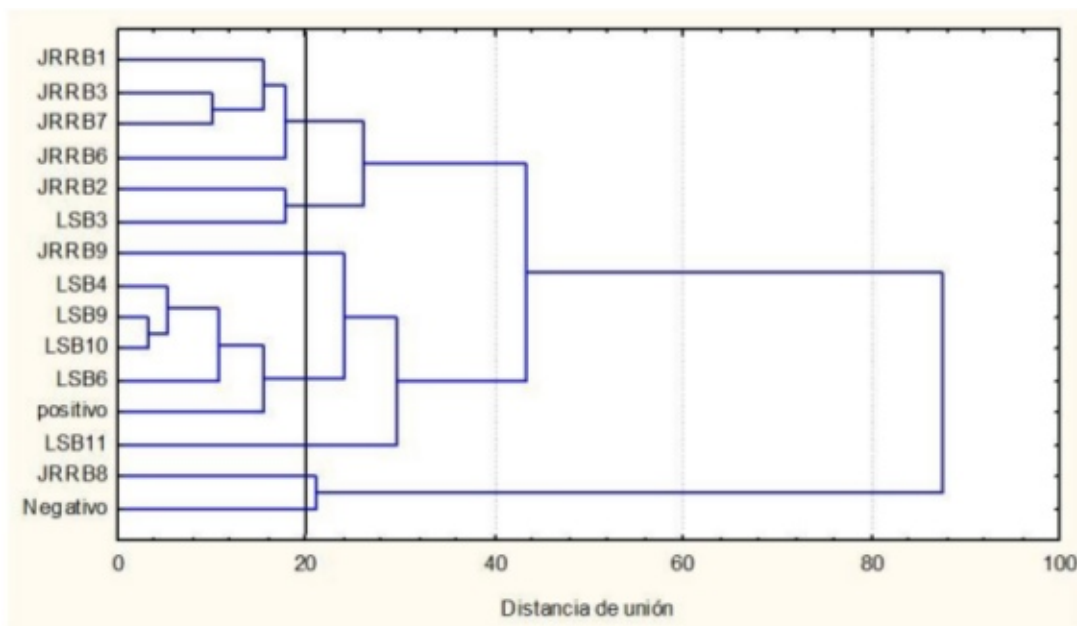


Fig. 3: Dendrograma para el agrupamiento de las cepas de acuerdo a la capacidad de producir auxinas, fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos e inhibir el crecimiento de hongos patógenos. Dendrograma calculado a partir de los valores obtenidos en los experimentos. El control positivo está formado por los valores más altos obtenidos en cada uno de los experimentos y el control negativo por los más bajos.

químicos y fungicidas, lo que contribuiría a la obtención de alimentos y la preservación del medio ambiente.

En este trabajo se obtuvieron trece cepas a partir del cultivo del arroz con potencialidades para la promoción del crecimiento y el control biológico de hongos fitopatógenos. Se demostró que producen auxinas estimuladoras del crecimiento vegetal, solubilizan fosfatos y fijan nitrógeno, lo que pudiera actuar en la promoción del crecimiento del cultivo del arroz. A la vez ejercen efecto antagónico contra cuatro hongos, entre ellos *Pyricularia grisea*, el principal devastador de este cultivo, lo que permitiría su utilización en el control biológico.

Referências Bibliográficas:

- ALIKHANI, H.A. et al. **Phosphate solubilization activity of rhizobia native Iranian soils**. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, Springer, 2007. p.35-41.
- ASLIM, et al. Determination of some properties of Bacillus isolated from soil. **Turk J Biol**, v.26, p. 41-48, 2002.
- BASHAN, Y. et al. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Terra*, v.14, n.2, p.159-192, 1996.
- BENEDUZI, A. et al. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 39, p. 311, 2008.
- BERG, G. et al. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v.51, p.215–229, 2005.
- BRENCIC, A.; WINANS, S. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. **Microbiol. Mol. Biol. Reviews**, v.69, p.155-194, 2005.
- CLAUS, D.; BERKELEY, R. C. W. Genus *Bacillus* Cohn 1872. In: SNEATH, P. H. A., MAIR, N. S., SHARPE, M. E. & HOLT, J. G.. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. vol. 2, p. 1105–1139.
- COMPANT, S. et al. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. **App. Environm. Microbiol.**, v.71, n.9, p.4951–4959, 2005.
- EUZEBY, J. P. **List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature**. Fecha de consulta mayo 2010, <http://www.bacterio.cict.fr/index.html>, 2009.
- FAO. **Rice Market monitor**. Vol X No 3, 2008.
- GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. A critical examination of the specificity of the Salkowsky reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied Environ. Microbiol.**, v.61, p.793-796, 1994.
- GUTIERREZ-MAÑERO F.J., et al. The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.) growth. II Characterisation and biological assays of metabolites from growth promoting and growth inhibiting bacteria. **Plant Soil**, v.182, p.67-74, 1996.
- IDRISS, E. E. et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. **Microbiology**, 148: 2097–2109, 2002.
- KABIR, M., et al. Oligonucleotide probes based on 16S rRNA sequences for the identification of four *Azospirillum* species. **Can. J. Microbiol.**, v.41, p.1081-1087, 1995.
- KAYODE-ISOLA, T.M., et al. Response of resident bacteria of a crude oil-polluted river to diesel oil. **Am.-Eurasian J. Agro.**, v. 1, p. 6, 2008.
- KHAN, M. S. et al. Functional Diversity Among Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Current Status. KHAN, M.S. et al. (eds.), **Microbial Strategies for Crop Improvement**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p.105-132, 2009
- LIU, X. et al. Colonization of Maize and Rice Plants by Strain *Bacillus megaterium* C4. **Current Microbiology**, v.52, p.186-190, 2006.
- MANDAL, M., et al. Plasmid-Mediated Dimethoate Degradation by *Bacillus licheniformis* Isolated from a FreshWater Fish Labeo rohita. **J. Biomed. Biotechnol.**, v. 3, p. 280, 2005.
- MIRANDA., C. A. C. et al. **Species-level identification of Bacillus strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths análisis**. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 93, p.297–304, 2008.
- NAUTIYAL, S. C. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganism. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, p.265-270, 1999.
- NCCLS. Natural Committee for Clinical laboratory

- standards. **Performance standards for antimicrobial Disk Susceptibility Test. Approved standard.** M2-A5., v.13, n.24, 1993.
- NEZARAT, S.; GHOLAMI, A. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving seed germination, seedling growth and yield of maize. **Pak J Biol Sci.**v.12, p.26-32, 2009.
- PARK, C. et al. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. **Microbiological Research**, v.160, n.2, p.127-133, 2005.
- RENCHÉ, M. H.; FIUZA, L. M. Bacterial diversity in rice-field water in Rio Grande do Sul. **Braz. Journal of Microbiol.**, v.36, p.253-257, 2005.
- SILVA, L. R. et al. Microorganisms with capacity for phosphate solubilization in Dao red wine (Portugal). VELAZQUEZ, E. and RODRIGUEZ-BARRUECO, C. (eds.), **First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization**, Springer, p.245-248, 2007.
- SOUCHIE, E. L. et al. Communities of P-Solubilizing Bacteria, Fungi and Arbuscular Mycorrhizal Fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ-Brazil. **An Acad Bras Cienc**, v.78, n.1, p.183-193, 2006.
- SWAIN M. R. et al. Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. **Pol J Microbiol.**, v.56, n.2, p.103-10, 2007.
- THAKURIA, D., et al. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. **Current Science**, v.86, n.7, p.978-985, 2004.
- TRIVEDI, P. et al. Growth promotion of rice by phosphate solubilizing bioinoculants in a Himalayan location. In: VELAZQUEZ, E. and RODRIGUEZ-BARRUECO, C.. **First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization**. Springer, 2007. p.291-299.
- WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.487-511, 2001.
- WILSON, P.W.; KNIGHT, S.C. **Experiments in bacterial physiology**. Burgess, Minneapolis, USA, p.49, 1952.
- WU, W. S. et al. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for Control of *Alternaria cosmosa* and *A. patula* of *Cosmos sulfurous* (Yellow Cosmos) and *Tagetes patula* (French Marigold). **Phytopathology**, v.155, p.670-675, 2007.
- ZAHIR A.Z. et al. 2004. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Applications and Perspectives in Agriculture. *Advances in Agronomy*, v.81, p.97-108.
- ZHAO, C. H. et al. N-acyl Homoserine Lactonase Promotes Prevention of Erwinia Virulence with Zwittermicin A-Producing Strain Bacillus cereus. **Biotechnology and Bioengineering**, v.100, n.3, p.599 - 603, 2008.